



SKRIPSI

**BIODEKOLORISASI PEWARNA METILEN BIRU OLEH
BAKTERI *Ralstonia picketti***

**YULINAR DWI NUR AZIZAH
NRP. 01211440000084**

**Dosen Pembimbing
Adi Setyo Purnomo, S.Si, M.Sc, Ph.D**

**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS ILMU ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2018**



SCRIPT

**BIODECOLORIZATION OF METHYLENE BLUE BY
BACTERIA *Ralstonia picketti***

**YULINAR DWI NUR AZIZAH
NRP. 0121144000084**

**Supervisor
Adi Setyo Purnomo, S.Si, M.Sc, Ph.D**

**DEPARTEMENT OF CHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2018**

**BIODEKOLORISASI PEWARNA METILEN BIRU OLEH
BAKTERI *Ralstonia picketti***

SKRIPSI

Disusun Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh
Gelar Sarjana Program Studi S-1
Departemen Kimia
Fakultas Ilmu Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Surabaya

YULINAR DWI NUR AZIZAH
NRP. 01211440000084

**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS ILMU ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2018**

LEMBAR PENGESAHAN
BIODEKOLORISASI PEWARNA METILEN BIRU OLEH
BAKTERI *Ralstonia Picketti*
SKRIPSI

Disusun oleh :

YULINAR DWI NUR AZIZAH
NRP. 01211440000084

Surabaya, 22 Januari 2018

Dosen Pembimbing


Adi Setyo Purnomo, S.Si, M.Sc, Ph.D.
NIP. 19800724 200812 1 002

Mengetahui,
Kepala Departemen Kimia

Prof. Dr. Didik Prasetyoko, M.Sc.
NIP. 19710616 199703 1 002

BIODEKOLORISASI PEWARNA METILEN BIRU OLEH BAKTERI *Ralstonia pickettii*

Nama : Yulinar Dwi Nur Azizah
NRP : 01211440000084
Jurusan : Kimia FIA – ITS
Dosen Pembimbing : Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D.

ABSTRAK

Industri tekstil dan produk tekstil merupakan industri yang cukup berkembang di Indonesia. Seiring dengan perkembangan industri tekstil yang terus meningkat produksi limbah industri tekstil pun juga ikut meningkat. Salah satu jenis limbah yang dihasilkan dari industri tekstil adalah limbah pewarna tekstil metilen biru (MB). Selain berbahaya bagi lingkungan, MB juga menimbulkan beberapa efek negatif pada manusia, sehingga diperlukan dekolorisasi MB yang efisien, dimana salah satunya menggunakan mikroorganisme. Pada penelitian ini dilakukan biodekolorisasi pewarna tekstil MB oleh bakteri *Ralstonia pickettii*. Dekolorisasi dilakukan pada media cair *nutrient broth* (NB) dengan konsentrasi MB 100 mg/L. Analisa dekolorisasi metilen biru dilakukan menggunakan instrumen UV-Vis dan LC-TOF/MS. Dari penelitian ini terbukti bahwa *R. pickettii* mampu mendekolorisasi MB 98% selama 18 jam proses dekolorisasi.

Kata kunci : *biodekolorisasi, metilen biru, Ralstonia pickettii, nutrient broth*

BIODECOLORIZATION OF METHYLENE BLUE BY BACTERIA *Ralstonia pickettii*

Name : Yulinar Dwi Nur Azizah
NRP : 01211440000084
Department : Kimia FIA – ITS
Supervisor : Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D.

ABSTRACT

Textile industry and its product are advancing in Indonesia. Along with it, waste of textile industry is also increasing. Methylene blue (MB) is one of common textile dye in the textile industry. In addition to being harmful to the environment, MB also causes some serious effects to human such as cyanosis, hyperpyrexia dan many more. Therefore, it is necessary to find method to decolorize MB efficiently. In this research, biodecolorization of MB by *Ralstonia pickettii* was done. Decolorization was performed on nutrient broth medium (NB) with concentration of MB 100 mg/L. Degradation of MB was analyzed using UV-Vis and LC-TOF/MS instrument. As result, it is proven that *R. pickettii* was able to decolorize MB up until 98% during 18 hours of incubation process.

Key words : biodecolorization, methylene blue, Ralstonia pickettii, nutrient broth

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang selalu melimpahkan Rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan dengan baik naskah tugas akhir yang berjudul **“BIODEKOLORISASI PEWARNA METILEN BIRU OLEH BAKTERI *Ralstonia picketti*”**.

Tulisan ini tidak akan terwujud tanpa bantuan, dukungan, doa, serta dorongan semangat dari semua pihak. Sehingga penulis sangat berterima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Didik Prasetyoko, M.Sc. selaku Kepala Departemen Kimia atas fasilitas yang diberikan.
2. Dra. Ratna Edianti, MS., Ph.D selaku Kepala Prodi Program Studi Kimia S1.
3. Wahyu Prasetyo Utomo, S.Si., M.Si selaku dosen wali.
4. Adi Setyo Purnomo, S.Si, M.Sc, Ph.D selaku Dosen Pembimbing yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan selama proses penyusunan naskah Skripsi ini.
5. Drs. Refdinal Nawfa, M.S selaku kepala laboratorium Kimia Mikroorganisme atas fasilitas yang diberikan.
6. Kedua orang tua yang selalu memberikan dukungan, semangat, serta doa yang tiada henti.
7. Teman-teman Kimia angkatan 2014 yang selalu membantu menyelesaikan kesulitan penulis dalam menyelesaikan naskah ini.
8. Rekan-rekan seperjuangan di *Mikronian Kingdom* dan Himpunan Mahasiswa Kimia ITS khususnya departemen Hubungan Luar atas semua doa dan pengertiannya.
9. *Partner* terbaik Ilham Nurirrofiq yang telah meminjamkan laptop dan senantiasa memberi dukungan moral.
10. Teman-teman yang selalu ada disaat suka dan duka yaitu, Afifah Nur Ubaidillah, Nabila Fauziah Fardani, Suci Kurnia Ilahi.

Penulis menyadari bahwa penulisan naskah tugas akhir ini tidak lepas dari kekurangan, oleh karena itu penulis

mengharapkan kritik dan saran untuk dapat meningkatkan kualitas dan perbaikan.

Surabaya, 15 Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
Latar Belakang	1
Rumusan Masalah	4
Tujuan Penelitian	5
Batasan Masalah	5
Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
Zat Pewarna Tekstil.....	7
Zat Warna Thiazine.....	8
Metilen Biru	9
Dampak Limbah Pewarnaan Tekstil	12
Bioremediasi dan Biodegradasi.....	13
Biodekolorisasi.....	15
Biodegradasi Metilen Biru oleh Bakteri	18
<i>Ralstonia pickettii</i>	18
Metode Analisa	19
Spektrofotometri <i>UV-Vis</i>	19
Turbidimetri	22
<i>LC-TOF/MS</i>	23
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	27
Alat dan Bahan.....	27
Alat.....	27
Bahan	27
Regenerasi Bakteri	27
Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri	27
Biodekolorisasi Metilen Biru oleh <i>R. picketti</i> pada	

Media Cair.....	27
Analisa Dekolorisasi Metilen Biru dan Metabolit	
Produknya	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	31
Regenerasi Bakteri <i>R. pickettii</i>	31
Pembuatan Kurva Pertumbuhan	32
Biodekolorisasi Metilen Biru oleh <i>R. pickettii</i>	34
Analisa Dekolorisasi Metilen Biru dan Metabolitnya	
Menggunakan LC-TOF/MS.....	39
BAB V KESIMPULAN	47
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN.....	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1. Grafik perbandingan perkembangan konsumsi tekstil dan produk tekstil dengan laju pertumbuhan penduduk di Indonesia tahun 2002-2010.....	1
Gambar 2.1. Struktur model thiazine	9
Gambar 2.2. Struktur metilen biru.....	10
Gambar 2.3. Reaksi pembentukan MB.....	11
Gambar 2.4. Skema alat spektrofotometer <i>UV-Vis</i>	20
Gambar 2.5. Kurva pertumbuhan <i>R. pickettii</i> dengan metode turbidimetri	21
Gambar 2.6. Skema alat HPLC	24
Gambar 2.7. Skema alat TOF MS	25
Gambar 4.1. Kurva pertumbuhan <i>R pickettii</i> a. fase lag, b. fase eksponensial, c. fase satsioner, d. fase kematian	34
Gambar 4.2. Profil dekolorisasi metilen biru	35
Gambar 4.3. Degradasi MB oleh <i>R. pickettii</i>	37
Gambar 4.4. Kromatogram Hasil Dekolorisasi MB oleh <i>R. pickettii</i> selama 18 jam	40
Gambar 4.5. Usulan jalur dekolorisasi MB oleh <i>R. picketti</i>	43
Gambar 4.6. Spektra MS Metilen Biru.....	44

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Hubungan dosis MB dengan dampaknya terhadap tubuh.....	12
Tabel 4.1. Hasil dekolorisasi metilen biru oleh <i>R. pickettii</i>	38
Tabel 4.2 Hasil analisa metabolit produk dekolorisasi MB dengan LC-TOF MS	42

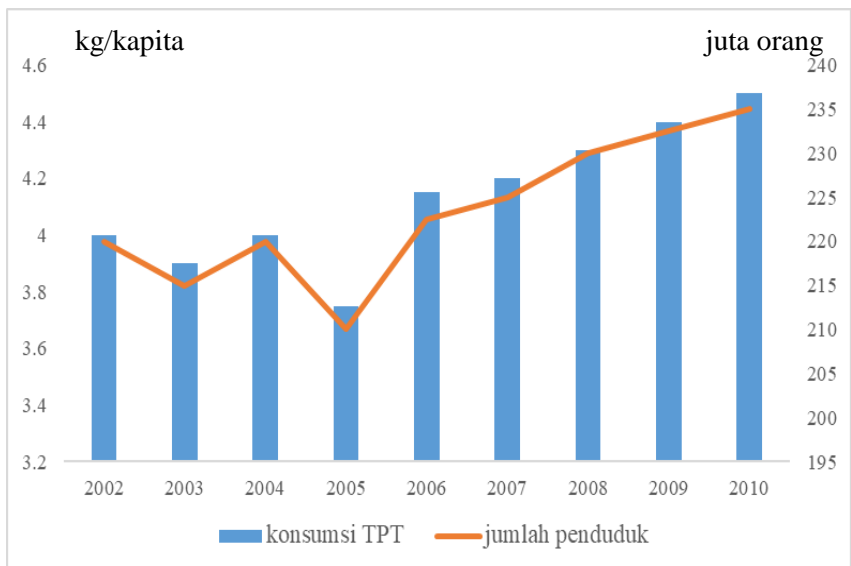
Karya ini kupersembahkan untuk
Bapak, Ibu dan Adik tercinta, para sahabatku
Teman-temanku angkatan 2014 (GALAXY)
Teman seperjuangan di *Mikronian Kingdom*
Serta, rekan-rekan HUBLU dan HIMKA ITS

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Industri tekstil dan produk tekstil merupakan industri yang cukup berkembang di Indonesia. Perkembangan ini berhubungan dengan peranan tekstil sebagai salah satu kebutuhan pokok manusia selain pangan dan papan. Hal tersebut mengakibatkan konsumsi produk tekstil sebagai sandang meningkat pesat seiring dengan laju pertumbuhan penduduk. Perkembangan konsumsi produk tekstil di Indonesia sejak tahun 2002-2010 ditunjukkan pada Gambar 1.1. (Hermawan, 2011).



Gambar 1.1. Grafik perbandingan perkembangan konsumsi tekstil dan produk tekstil dengan laju pertumbuhan penduduk di Indonesia tahun 2002-2010 (Hermawan, 2011).

Pada tahun 2011 industri tekstil di Indonesia mengalami penurunan produksi yang cukup drastis karena banyak industri yang tutup, tetapi tahun berikutnya produksi meningkat kembali karena dampak dari permintaan import TPT global yang meningkat (Trademap, 2016). Seiring dengan perkembangan industri tekstil yang terus meningkat produksi limbah industri tekstil pun juga ikut meningkat. Salah satu jenis limbah yang dihasilkan dari industri tekstil adalah limbah pewarna tekstil. Pewarna sintetik, padatan tersuspensi dan zat organik terlarut merupakan bahan berbahaya yang sering ditemukan dalam limbah industri tekstil (Benkli dkk., 2005). Kandungan pewarna sintetik yang cukup tinggi pada limbah industri tekstil disebabkan oleh penggunaan zat warna sintetik yang sering digunakan dalam pada proses pewarnaan tekstil. Limbah cair dari proses pewarnaan tekstil tersebut merupakan sumber utama limbah industri tekstil yang mencemari lingkungan (Manurung dkk., 2004).

Dalam industri tekstil salah satu pewarna yang dipakai adalah metilen biru (MB). MB sering digunakan sebagai pewarna tekstil di dunia industri karena MB mudah diperoleh dan harganya cukup murah. Zat warna MB merupakan zat warna thiazine yang menjadi dasar dalam proses pewarnaan kulit, kain mori, kain katun, dan tannin (Hamdaoui dan Chiha, 2006). Dalam proses pewarnaan, zat warna MB hanya digunakan sekitar 5% sedangkan 95% sisanya akan terbuang sebagai limbah. Zat warna MB tersebut cukup stabil sehingga cukup sulit terdegradasi di alam dan berbahaya bagi lingkungan apalagi dalam konsentrasi besar. MB tersusun atas senyawa aromatik yang menyebabkan limbah pewarna tekstil tersebut sulit terdegradasi. Selain itu, sebagian besar zat warna dibuat agar memiliki resistensi terhadap pengaruh lingkungan seperti efek pH, suhu dan mikroba (Qodri, 2011). Hal tersebut menyebabkan senyawa tersebut dapat menaikkan Chemical Oxygen Demand (COD) dan dapat merusak keseimbangan ekosistem lingkungan

yang ditandai dengan matinya organisme perairan di sekitar lokasi pembuangan limbah (Riyanto dan Tatang, 2009).

Selain berbahaya bagi lingkungan, MB juga menimbulkan beberapa efek terhadap manusia dan hewan seperti iritasi saluran pencernaan jika tertelan, sianosis jika terhirup dan iritasi pada kulit jika terhirup (Hamdaoui dan Chiha, 2006). MB juga mempunyai sifat karsinogenik dan mutagenik yang menyebabkan kanker dan sangat berbahaya bagi makhluk hidup (Sugiharto, 1987). Melihat buruknya dampak dari MB Gubernur Jawa Timur memberikan batasan kandungan MB pada limbah cair yang akan dibuang ke lingkungan melalui Peraturan Gubernur Jawa Timur No. 72 Tahun 2013 tentang baku mutu air limbah bagi industri dan/atau kegiatan usaha lainnya. Dalam peraturan Gubernur tersebut gubernur Jawa Timur membatasi jumlah maksimal kandungan MB pada limbah cair yaitu sebesar 5 mg/L.

Upaya penanganan limbah pewarna tekstil dapat dilakukan dengan cara kimia, fisika maupun biologis. Penanganan secara kimia biasanya dilakukan dengan menambahkan koagulan. Namun, penanganan dengan penggunaan koagulan akan menghasilkan lumpur (*sludge*) dalam jumlah yang relatif besar, sehingga akan menimbulkan permasalahan baru. Penanganan secara fisika dapat dilakukan dengan menggunakan metode adsorpsi. Namun pada metode tersebut diperlukan biaya yang cukup tinggi karena proses kimianya yang relatif mahal (Manurung, 2004). Penanganan yang dinilai cukup efisien dan cukup murah adalah penanganan dengan cara biologis. Metode yang digunakan dalam cara biologis yaitu dengan metode biodegradasi. Pada metode ini penanganan limbah dilakukan dengan memanfaatkan aktifitas biologis dari mikroorganisme dalam mendegradasi limbah pewarna tekstil.

Dalam metode biodegradasi, salah satu mikroorganisme yang dapat digunakan dalam biodegradasi adalah bakteri. Terkait dengan degradasi pewarna tekstil bakteri dipilih sebagai salah satu agensia bioremediasi yang mampu mendegradasi

komponen pewarna yang bersifat toksik dan mengubahnya menjadi senyawa kimia yang tidak berbahaya. Kemampuan bakteri dalam mendegradasi limbah pewarna berkaitan erat dengan enzim ekstraseluler yang dihasilkan bakteri tersebut. Enzim ini dapat merombak senyawa aromatik, polimer sintetik, dan zat warna melalui reaksi reduksi - oksidasi, yang pada akhirnya akan mengoksidasi secara sempurna senyawa - senyawa karbon menjadi CO_2 dan H_2O (Siswanto dkk., 2007).

Salah satu jenis bakteri yang mampu menghasilkan enzim untuk mendegradasi senyawa polutan aromatik adalah *Ralstonia pickettii*. Plaza, dkk. (2006) melaporkan bahwa bakteri *R. pickettii* mampu mendegradasi BTEX. Senyawa BTEX (benzena, toluena, etilbenzena, dan tiga isomer xilena) diklasifikasikan sebagai polutan utama dalam lingkungan. Senyawa tersebut merupakan senyawa volatil hidrokarbon monoaromatik yang biasa ditemukan dalam minyak mentah dan produk minyak bumi seperti bensin dan solar (Budavari, 1996). *R. pickettii* juga memiliki enzim monooksigenase yang dapat menghidroksilasi toluena dan benzena menjadi intermediet cresol dan fenol. Senyawa intermediet tersebut akan didegradasi lebih lanjut (Kukor dan Olsen 1990, 1992; Olsen dkk., 1994). Selain itu, Ryan dkk. (2007) menjelaskan bahwa bakteri jenis *R. pickettii* mampu menghasilkan enzim hidroksilase berupa 2,4,6-trichlorophenol-4-dechlorinase yang berperan dalam degradasi polutan terklorinasi berupa triklorofenol.

Oleh karena itu dalam penelitian ini penulis akan menguji kemampuan bakteri *R. pickettii* dalam mendekolorisasi limbah pewarna tekstil MB sebagai inovasi dalam upaya penanganan masalah limbah pewarna tekstil.

1.2 Rumusan Masalah

Bedasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, didapatkan permasalahan yang akan diangkat pada penelitian ini, zat warna metilen biru merupakan zat warna yang cukup stabil sehingga cukup sulit terdegradasi di alam dan berbahaya bagi lingkungan,

dan dibutuhkan metode yang efisien untuk mendegradasi metilen biru. Salah satunya dengan cara menggunakan mikroorganisme. Pada penelitian ini dilakukan dekolorisasi metilen biru secara biologi (biodegradasi) menggunakan bakteri *R. picketti*. *R. picketti* menghasilkan enzim ekstraseluler yang memiliki kemampuan degradasi beberapa polutan aromatik. Namun *R. picketti* belum pernah digunakan untuk mendekolorisasi metilen biru, maka dari itu penelitian ini perlu dilakukan.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan bakteri *R. pickettii* dalam mendekolorisasi MB dan mengidentifikasi metabolit produk yang dihasilkan.

1.4 Batasan Masalah

Permasalahan pada penelitian ini dibatasi pada konsentrasi MB 100 mg/L. Dekolorisasi MB dilakukan dalam waktu 18 jam pada suhu 30°C. Penggunaan media NB cair sebagai uji kuantitatif.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini antara lain :

1. Memberikan data ilmiah mengenai kemampuan bakteri *R. pickettii* dalam mendekolorisasi MB.
2. Memberikan referensi dan alternatif yang aktual mengenai penanganan limbah pewarna tekstil khususnya MB.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Zat Pewarna Tekstil

Zat warna merupakan suatu senyawa yang mampu memberikan warna pada suatu objek tertentu. Kemampuan memberi warna tersebut berkaitan dengan proses terjadinya warna dimana senyawa tersebut mengabsorpsi energi dan mengemisikannya pada daerah panjang gelombang sinar tampak yaitu 400-700 nm. Pada umumnya senyawa yang mampu menimbulkan serapan pada panjang gelombang tersebut merupakan senyawa organik tak jenuh yang memiliki sistem konjugasi (Sugiharto, 1987).

Zat pewarna merupakan substansi yang memiliki warna, namun tidak semua substansi yang berwarna merupakan zat pewarna. Zat pewarna mampu mereaksikan dirinya dengan sebuah substrat untuk memberi warna substrat tersebut baik secara permanen maupun sementara. Dalam bidang tekstil zat pewarna harus dapat tahan terhadap proses pencucian dan mampu memberikan warna yang stabil terhadap substrat yang diwarnai (Chatwal, 2009).

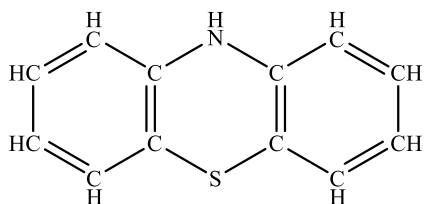
Secara umum zat warna terdiri dari gabungan antara zat organik tak jenuh dengan gugus kromofor dan aoksokrom. Zat organik tak jenuh yang digunakan dalam pembentukan zat warna dapat berupa senyawa hidrokarbon aromatik dan turunannya, senyawa fenol dan turunannya serta senyawa-senyawa hidrokarbon yang mengandung nitrogen. Dalam pembentukan zat warna, gugus kromofor berfungsi sebagai pembawa warna dan aoksokrom sebagai pengikat warna. Beberapa contoh gugus kromofor antara lain gugus nitroso (NO), Nitro (NO_2 / NN-OOH), grup azo (R-N=N-R'), grup karbonil (-C=O), dsb. Sedangkan

untuk gugus aksokrom dibagi menjadi dua golongan yaitu golongan kation ($-NII_2$; $NIIR$; $j -NR_2$) dan golongan anion ($-SO_3H$; $-OH$; $-COOH$) (Manurung, 2004).

Zat warna dapat diklasifikasikan berdasarkan struktur kromofornya dan cara pengaplikasiannya pada substrat. Beberapa pengelompokan pewarna berdasarkan struktur kromofornya antara lain: pewarna azo, antrakuinon, heterosiklik, trifenil metan, thiazine dan sebagainya. Pengelompokan pewarna berdasarkan cara pengaplikasiannya pada substrat dibagi menjadi beberapa kelompok antara lain : pewarna *reaktiv*, pewarna *direct*, pewarna *vat*, pewarna *sulfur*, pewarna *disperse*, pewarna *basic*, pewarna *solvent*, pewarna *mordant* dan pewarna *asam* (Gadd, 2001).

2.2 Zat Warna Thiazine

Pewarna thiazine merupakan pewarna dengan kromofor utama gugus thiazine. Pewarna jenis ini memiliki kesamaan struktur dengan indamin dan indophenol dimana ketiganya sama-sama memiliki struktur thiodipenilamine. Hal yang membuat berbeda adalah pewarna thiazine memiliki satu atom sulfur pada molekulnya sedangkan indamin dan indophenol tidak memiliki atom sulfur. Atom sulfur pada molekul thiazine menghubungkan dua cincin benzen pada molekul thiazine dengan posisi orto terhadap gugus imido dan posisi para terhadap atom N. Hal tersebut membuat gugus thiodipenilamine pada thiazine memiliki tiga cincin dimana struktur dari molekul thiazine digambarkan pada Gambar 2.1 (Rizqi, 2014).



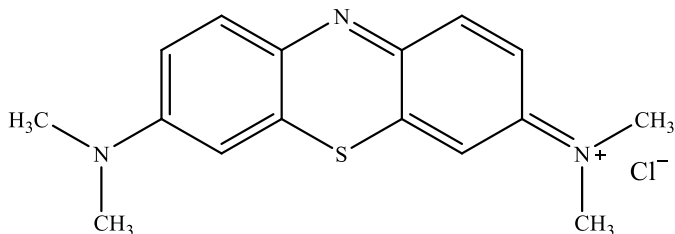
Gambar 2.1 Struktur molekul thiazine (Rizqii, 2014).

Senyawa thiazine dapat dibuat melalui reaksi antara gugus amido dengan thiodiphenilamin dan oksidasi yang menghasilkan gugus leuco. Jika paradiamin dioksidasi dengan adanya hidrogen tersulfurasi dalam larutan asam maka satu atom nitrogen akan terlepas sebagai amonia dan dua molekul diamin akan bersatu. Selanjutnya atom sulfur akan masuk diantara dua molekul diamin yang bersatu sehingga menghasilkan senyawa thiazine (Rizqi, 2014).

Pewarna thiazine memiliki kestabilan yang lebih tinggi dibandingkan indophenol. Hal tersebut dikarenakan senyawa ini tidak menghasilkan kuinon ketika direaksikan dengan asam. Secara umum senyawa thiazine ini mampu menghasilkan warna ungu dan biru. Pewarna thiazine yang sering digunakan antara lain MB, thionoline, oksithiodiphenilamide, thionol dan sebagainya (Rizqi, 2014).

2.3 Metilen Biru

Metilen Biru (MB) merupakan pewarna dengan rumus molekul ($C_{16}H_{18}ClN_3 \cdot 3H_2O$) dan memiliki nama kimia [*3,7-bis (dimetilamino)-phenazathionium chloride Tetramethylthionine chloride*]. Berdasar strukturnya MB merupakan pewarna thiazine kationik yang merupakan senyawa heterosiklik aromatik dimana struktur MB pada Gambar 2.2 (Miclescu, 2010).



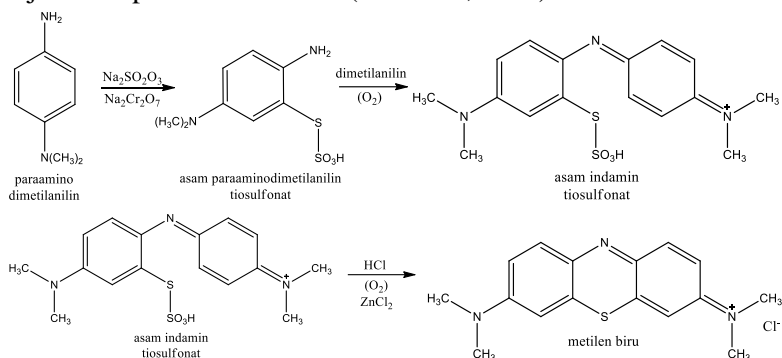
Gambar 2.2 Struktur Metilen Biru (Miclescu, 2010).

MB memiliki warna biru gelap dalam keadaan teroksidasi dan tidak berwarna dalam bentuk reduksinya (leuco MB). MB dan leukometilen biru keduanya ada dalam larutan dan menjadi pasangan reaksi reduksi oksidasi reversibel atau pasangan pemberi dan penerima elektron (Chatwal, 2009).

MB pertama kali disintesis oleh Caro pada tahun 1876. Caro mensintesis MB dalam skala industri dengan cara mengoksidasi dimethylparaphenylenediamin dalam hidrogen tersulfurasi (Nietzki, 1888). Secara fisik MB memiliki warna biru gelap-hijau dalam keadaan teroksidasi dan tidak berwarna dalam keadaan tereduksi. MB memiliki berat molekul 319 g/mol dan titik leleh pada 180°C. MB larut dalam air dengan kelarutan sebesar 35,5 g/l (Miclescu, 2010).

Secara umum MB dapat dibuat dengan menitrasi dan mereduksi N, N- dimethylaniline menjadi paraaminodimethylaniline. Selanjutnya paraaminodimethylaniline dikonversi menjadi asam thiosulfat dengan penambahan sodium thiosulphate, sodium dichromate dan asam sulfat. Setelah terbentuk paraaminodimethyl aniline thiosulphonic acid dilakukan penambahan dimethylaniline dalam kondisi oksidasi untuk membentuk indamine thiosulphonic acid. Indamine

thiosulphonic acid selanjutnya dioksidasi dengan penambahan HCl dan ZnCl_2 sehingga terbentuk MB. Reaksi pembentukan MB dijelaskan pada Gambar 2.3. (Miclescu, 2010).



Gambar 2.3 Reaksi pembentukan MB (Miclescu, 2010)

Secara farmakokinetik MB memiliki volume distribusi dalam tubuh sebesar 20mg/kg. MB dapat terabsorb oleh mulut sebesar 53-97% dan mampu terionisasi sempurna pada pH lambung. Secara metabolisme MB dapat tereduksi dalam jaringan tubuh menjadi leucoMB (65-85 %). MB dapat disekresikan oleh tubuh dalam bentuk leucoMB yang terkandung dalam empedu, feses dan urine (Miclescu, 2010).

Pada awalnya MB ditemukan sebagai obat. Pada tahun 1891 aktivitas pelumuran MB diteliti oleh Paul Ehrlich sebagai dasar pengembangan kemoterapi modern, selanjutnya pada abad 19 -20 MB digunakan sebagai obat malaria pada manusia. Namun seiring berjalannya waktu penggunaan MB sebagai obat membawa efek negatif bagi tubuh antara lain sianosis. Dalam kadar dosis tertentu MB juga memberi dampak racun pada hewan dan manusia (Miclescu, 2010). Hubungan antara dosis MB terhadap dampaknya bagi tubuh digambarkan dalam Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Hubungan dosis MB dengan dampaknya terhadap tubuh (Miclescu, 2010).

Objek Pengamatan	Dosis MB	Dampak
Tikus Got	5-50 mg/kg 1250 mg/kg (LD50)	<ul style="list-style-type: none"> - Kerusakan neuron - Pengurangan isofluran MAC
Tikus putih	3500 mg/kg	
Kambing	40 mg/kg	
Anjing	10-20 mg/kg	<ul style="list-style-type: none"> - Hipotensi - Pengurangan SVR - Penyumbatan aliran darah - Hipertensi pulmonary
Manusia	2-4 mg/kg	Hemolitik amonia, Kerusakan kulit pada bayi
	7 mg/kg	Mual, Muntah, Gangguan pencernaan, nyeri pada dada, demam, perusakan hemoglobin
	7,5 mg/kg	Hiperpyrexia, Pusing
	20 mg/kg	Hipotensi
	80 mg/kg	Sianosis, Pembiruan kulit

Melihat banyaknya dampak negatif MB, penggunaan MB sebagai obat mulai dikurangi dan cenderung digunakan sebagai pewarna tekstil. Hal tersebut dikarenakan MB mudah didapat dan harganya yang cukup murah (Hamdaoui dan Chiha, 2006). MB secara prinsip merupakan pewarna kain katun. MB sulit digunakan sebagai pewarna pada kain wol. Hal ini disebabkan MB memiliki

afinitas yang rendah terhadap serat wol. Namun MB merupakan pewarna yang baik pada kain katun dan sutra karena seratnya yang halus (Nietzki, 1888). Dalam industri tekstil MB biasa digunakan sebagai pewarna kulit, kain mori, kain katun, sutra dan tanin (Hamdaoui dan Chiha, 2006).

2.4 Dampak Limbah Pewarnaan Tekstil

Pencemaran air atau penurunan mutu air diakibatkan oleh sejumlah kegiatan manusia salah satunya yang berasal dari industri tekstil yang tidak dikelola sebagaimana mestinya, namun dibuang langsung ke aliran air atau permukaan tanah. Limbah industri tekstil yang langsung dibuang ke sungai dapat menimbulkan pencemaran berupa : perubahan warna, bau dan rasa pada air; terhambatnya dan hilangnya aktivitas biologi perairan; pencemaran tanah dan air tanah; serta perubahan fisik tumbuhan, binatang dan manusia oleh zat kimia (Laksono, 2012).

Air limbah secara tidak langsung juga akan mempengaruhi kualitas air tanah. Tingkat pencemaran limbah tersebut jika tidak terlalu tinggi akan diikat dan dinetralkan oleh lapisan tanah, tetapi jika melebihi kapasitas tanah, maka kandungan limbah tersebut akan mencapai air tanah dan mencemarinya. Hal tersebut dipengaruhi oleh jarak sumur dengan sungai, jenis dan keadaan sumur, genangan air sungai, jenis cemaran dan curah hujan (Tejokusumo, 2007).

Muzamil (2010) menjelaskan kualitas air juga dapat diketahui melalui analisa sifat kimia air tanah. Sifat kimia air tanah yang diteliti meliputi kesadahan sebagai CaCO_3 , pH, unsur-unsur kimia dominan yang larut dalam air seperti, ion Natrium (Na^+), kalsium (Ca^{2+}), Magnesium (Mg^{2+}), Sulfat (SO_4^{2-}), Klorida (Cl^-), Besi (Fe^{2+}), serta unsur-unsur kimia yang lain sebagai indikator pencemar limbah domestik seperti: ion Nitrat (NO_3^-), Nitrit (NO_2^-

), Fosfat, BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) dan COD (*Chemical Oxygen Demand*).

2.5 Bioremediasi dan Biodegradasi

Bioremediasi merupakan salah satu perluasan ilmu dari bioteknologi lingkungan yang merupakan aplikasi dari penanganan polutan secara biologis. Sebagian besar bioremediasi terkonsentrasi pada penanganan polutan organik secara biologis. Metode yang dipakai adalah dengan mengubah senyawa polutan dari senyawa yang kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dan mendetoksifikasi polutan dengan memanfaatkan mikroorganisme. Pada umumnya mikroorganisme yang digunakan dalam bioremediasi adalah bakteri dan jamur. Salah satu metode bioremediasi yang sering digunakan adalah metode biodegradasi (Gadd, 2001).

Biodegradasi merupakan salah satu cabang dari bioteknologi lingkungan dimana memanfaatkan aktivitas mikroorganisme dalam menguraikan senyawa-senyawa kompleks menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana sehingga lebih ramah lingkungan (Yani, 2003). Mikroorganisme yang dapat digunakan dalam biodegradasi adalah mikroorganisme memiliki kemampuan memanfaatkan senyawa organik alami sebagai sumber energi serta mampu menghasilkan enzim yang mampu mendegradasi. Proses dekomposisi yang terjadi umumnya akan menghasilkan karbondioksida, metana, air, biomassa mikroba dan hasil sampingan yang lebih sederhana dibandingkan dengan senyawa awal yang didegradasi (Eris, 2006).

Dalam melakukan biodegradasi ada beberapa faktor yang mempengaruhi agar biodegradasi dapat berjalan optimal. Faktor-faktor tersebut antara lain kadar air, suhu, pH dan kadar oksigen. Kadar air sangat penting dalam proses biodegradasi, hal ini

dikarenakan untuk mendegradasi mikroorganisme yang digunakan harus berada pada tingkat kelembaban tertentu. Kelembaban optimum untuk melakukan biodegradasi adalah 30-90% kapasitas penyangga air. Kelembaban yang terlalu rendah menyebabkan kekeringan dan apabila terlalu tinggi akan mengurangi penyediaan oksigen (Dibble dan Bartha, 1979). Dalam proses biodegradasi suhu lingkungan juga mempengaruhi proses dari biodegradasi, hal ini dikarenakan suhu lingkungan mempengaruhi kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi dimana suhu tersebut dapat mempengaruhi reaksi-reaksi biokimia yang terjadi (Atlas, 1981). Hal lain yang mempengaruhi proses biodegradasi yaitu pH, bakteri umumnya tumbuh dengan baik pada pH 6,0-8,0. Secara tidak langsung akan mempengaruhi naik atau turunnya ketersediaan nutrisi khususnya fosfor (Udiharto, 1996). Kadar oksigen juga menjadi salah satu faktor yang berpengaruh pada biodegradasi dikarenakan dalam biodegradasi oksigen dibutuhkan sebagai akseptor elektron hal ini dikarenakan reaksi dasar dari proses biodegradasi adalah reaksi oksidasi. Kekurangan oksigen dapat menyebabkan laju biodegradasi menurun tajam (Cooney, 1984).

2.6 Biodekolorisasi

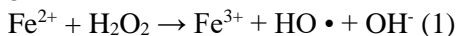
Biodekolorisasi merupakan proses biologi dari dekolourisasi. Dengan kata lain biodekolorisasi dapat diartikan sebagai proses penghilangan warna suatu senyawa dengan memanfaatkan suatu organisme. Hilangnya warna pada biodekolorisasi terjadi karena adanya perubahan struktur dari zat pembawa warna (kromofor) yang diakibatkan oleh proses metabolisme dari organisme yang digunakan untuk biodekolorisasi. Dalam proses biodekolorisasi terdapat dua metode utama yaitu dengan metode absorpsi dan

biodegradasi. Namun tak menutup kemungkinan dalam satu organisme mampu melakukan kedua metode biodekolorisasi tersebut (Gadd, 2001).

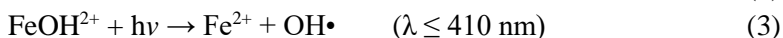
Dalam metode absorpsi penghilangan warna terjadi karena adanya penyerapan kromofom pewarna oleh miselium jamur. Kemampuan miselium menyerap kromofom didasarkan pada adanya perbedaan tegangan permukaan antara miselium dan kromofom. Dalam metode biodegradasi penghilangan warna terjadi karena adanya perubahan struktur molekul atau pemecahan molekul pewarna oleh metabolisme organisme yang digunakan. Perubahan struktur molekul atau pemecahan molekul yang terjadi pada metode biodegradasi dapat diakibatkan oleh interaksinya dengan enzim pendegradasi atau masuknya zat warna pada metabolisme organisme pendegradasinya (Gadd, 2001).

Dalam biodekolorisasi metode yang sering digunakan untuk mengukur terjadinya proses dekolorisasi adalah dengan pengukuran absorbansi. Dalam pengukuran proses dekolorisasi dilakukan dua kali pengukuran absorbansi. Pengukuran absorbansi pada λ_{\max} pertama dilakukan sebelum treatmen. Pengukuran absorbansi pertama tersebut dijadikan sebagai kontrol. Selanjutnya setelah dilakukan treatmen dilakukan pengukuran kedua pada λ_{\max} yang sama. Apabila terjadi penurunan nilai absorbansi maka hal tersebut mengindikasikan terjadinya proses dekolorisasi (Gadd, 2001). Dalam pengukuran dekolorisasi menggunakan metode absorbansi, untuk senyawa yang telah diketahui konsentrasinya dapat dimungkinkan menggunakan absorbansi diatas satu. Hal tersebut dikarenakan pengukuran dekolorisasi pada senyawa tersebut hanya melibatkan perbandingan antara absorbansi awal dengan absorbansi hasil treatmen (Akdogan, 2014). Dalam penelitiannya, Akdogan (2014) mengukur presentase dekolorisasi pewarna *reactive blue* 19 oleh

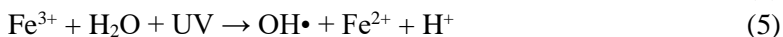
Coprinus plicatilis dimana absorbansi awalnya mencapai 2,4. Dalam penelitian lain Papic (2009) melakukan penelitian dekolorisasi pewarna *reactive yellow 3* (RY 3), *reactive blue 2* (RB 2) dan *reactive violet 2* (RV 2) oleh reaksi fenton. Produksi radikal OH oleh reagen fenton terjadi dengan cara penambahan garam H₂O₂ ke Fe²⁺:



Pereaksi ini adalah sistem oksidatif yang baik untuk pengolahan air limbah karena unsur besi sangat melimpah dan tidak beracun, selain itu hidrogen peroksida mudah ditangani dan aman bagi lingkungan. Tingkat degradasi polutan dapat ditingkatkan melalui reaksi fotokimia dalam proses UV/Fenton. Dalam penelitian ini, regenerasi Fe²⁺, dengan produksi radikal OH baru, mengikuti proses fotoreduksi:



Dalam proses UV / Fenton selain reaksi di atas, pembentukan radikal hidroksil juga terjadi dengan reaksi berikut:



Dimana dalam penelitian tersebut absorbansi awal RY 3 sebesar 1,847, absorbansi awal RB2 sebesar 1,082, dan absorbansi awal RV2 sebesar 2,107. Metode pengukuran absorbansi tersebut dapat digunakan untuk menentukan dekolorisasi yang terjadi merupakan degradasi atau adsorpsi. Dekolorisasi merupakan degradasi apabila rasio absorbansinya berkurang dan apabila rasio absorbansinya cenderung konstan maka biodekolorisasi tersebut merupakan adsorpsi (Gadd, 2001).

2.7 Biodegradasi Metilen Biru Oleh Bakteri

Dalam metode biodegradasi, salah satu mikroorganisme yang dapat digunakan dalam biodegradasi adalah bakteri. Terkait dengan degradasi pewarna tekstil bakteri dipilih sebagai salah satu agensia bioremediasi yang mampu mendegradasi komponen pewarna yang bersifat toksik dan mengubahnya menjadi senyawa kimia yang tidak berbahaya. Kemampuan bakteri dalam mendegradasi limbah pewarna berkaitan erat dengan enzim ekstraseluler yang dihasilkan bakteri tersebut.

Banyak penelitian sebelumnya yang menggunakan bakteri untuk mendegradasi metilen biru, contohnya *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* memiliki kemampuan degradasi MB yang baik. Sarioglu, dkk. (2017) menggunakan bakteri *P. aeruginosa* untuk enkapsulasi, dan polivinil alkohol (PVA) dan polietilen oksida (PEO) dipilih sebagai matriks polimer untuk penopang elektroskopis bakteri yang dienkapsulasi jaringan nanofibrous. Hasil dari penelitian Sarioglu, dkk. (2017) *P. aeruginosa* mampu mendegradasi MB hingga 80%.

2.8 *Ralstonia pickettii*

Ralstonia pickettii merupakan bakteri yang umumnya ditemukan di air dan tanah. *R. pickettii* merupakan bakteri jenis Gram-negatif dan merupakan oksidase positif. Bakteri ini memiliki bentuk basil (batang) dan melakukan respirasi secara aerob atau non fermentasi. Bakteri ini memiliki sifat patogen oportunistik baik pada kondisi rumah sakit maupun kondisi lingkungan (Ryan dkk., 2006). *R. pickettii* merupakan salah satu spesies dari genus *Ralstonia* yang banyak dijumpai pada lingkungan tandus, tercemar, oligotrofik atau lingkungan dengan nutrisi terbatas. Dalam penelitian lainnya Ryan dkk. (2007) melaporkan bahwa *R. pickettii* mampu mendegradasi polutan

xenobiotik seperti toluena dan trikloroetilena sebagai limbah industri. *R. pickettii* memiliki taksonomi sebagai berikut :

Kerajaan	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Betaproteobacteria
Ordo	: Burkholderiales
Famili	: Burkholderiaceae
Marga	: Ralstonia
Jenis	: <i>R. pickettii</i>

(Ryan dkk., 2006)

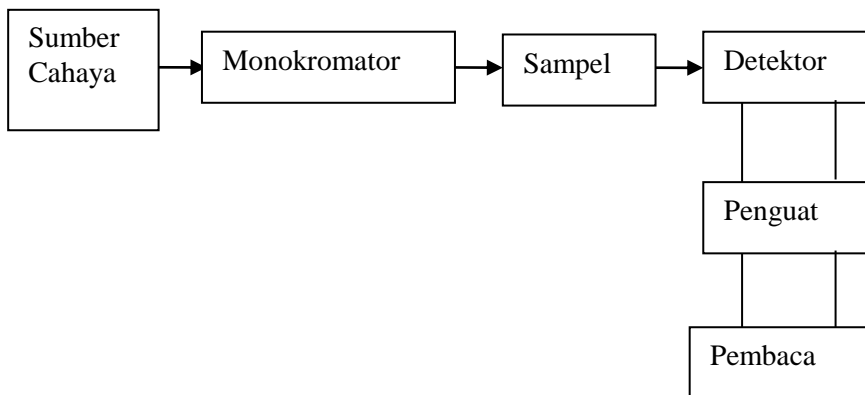
2.9 Metode Analisa

2.9.1 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan instrumentasi yang digunakan untuk mengukur serapan yang dihasilkan dari interaksi antara kimia antara radiasi elektromagnetik dengan molekul atau atom dari suatu zat kimia pada daerah sinar ultraviolet (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm). Jangkauan panjang gelombang yang tersedia untuk pengukuran membentang dari panjang gelombang pendek ultraviolet sampai ke garis inframerah (Skoog, 1998).

Prinsip dari spektrofotometri UV-Vis adalah mengukur jumlah cahaya yang diabsorpsi atau ditransmisikan oleh molekul-molekul di dalam larutan, sebagian energi cahaya tersebut akan diserap (diabsorpsi). Besarnya kemampuan molekul-molekul zat terlarut untuk mangabsorpsi cahaya pada panjang gelombang tertentu dikenal dengan istilah absorbansi (A). Nilai absorbansi setara dengan nilai konsentrasi larutan tersebut dan panjang berkas cahaya yang dilalui pada suatu point dimana presentase jumlah cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi diukur dengan phototube (Harmita, 2006).

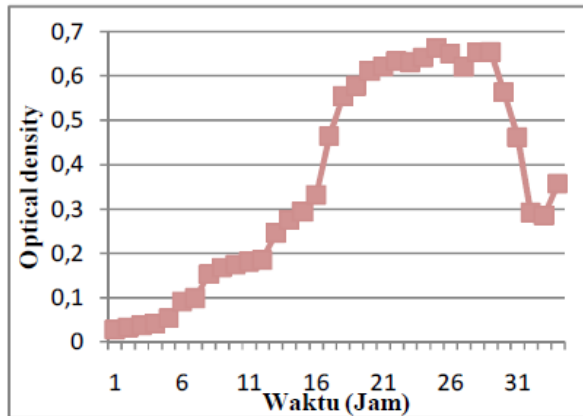
Data yang diperoleh dengan spektrofotometri UV-Vis biasanya berupa panjang gelombang maksimum (λ maks). Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang dimana terjadinya eksitasi elektronik yang memberikan absorbansi yang terbesar. Penentuan panjang gelombang maksimum yang pasti (tetap) dapat dipakai untuk identifikasi molekul yang bersifat karakteristik sebagai data sekunder. Dengan demikian spektrum UV-Vis dapat dipakai untuk tujuan analisa kualitatif dan kuantitatif. Sedangkan pokok kegunaan analisa spektrofotometri UV-Vis adalah untuk analisa kuantitatif karena melibatkan energi eksitasi yang cukup besar (Mulja dan Suharman, 1995). Secara umum skema alat spektrofotometer UV-Vis dijelaskan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Skema alat spektrofotometer UV-Vis (Mulja dan Suharman, 1995).

Dalam penelitian ini instrumentasi UV-VIS digunakan dalam pembuatan kurva pertumbuhan bakteri dan mengukur pengurangan intensitas warna. Kurva pertumbuhan bakteri merupakan kurva yang menunjukkan fase-fase pertumbuhan

bakteri (Maier, 2009). Pembuatan kurva pertumbuhan dalam penelitian ini dilakukan dengan metode turbidimetri pada *optical density* OD₆₀₀.



Gambar 2.5 Kurva pertumbuhan *Ralstonia pickettii* dengan metode turbidimetri (Asranudin, 2014).

Metode Turbidimetri merupakan metode pengukuran jumlah sel bakteri berdasarkan kekeruhan. Metode ini mengukur pengurangan intensitas cahaya pada spektrofotometer akibat adanya penghamburan cahaya oleh sel-sel bakteri yang ada pada kuvet. Adanya penghamburan cahaya tersebut mengakibatkan turunnya intensitas cahaya yang akan dinotasikan sebagai suatu nilai. Semakin besar nilai tersebut menunjukkan semakin banyak jumlah sel bakteri yang ada didalam kuvet (Widdel, 2010).

2.9.1.1 Turbidimetri

Turbidimetri merupakan analisa kuantitatif yang didasarkan pada pengukuran kekeruhan atau turbidan dari suatu larutan akibat adanya suspensi partikel padat dalam larutan. Artinya turbidimetri adalah analisa yang berdasarkan hamburan cahaya. Hamburan cahaya terjadi akibat adanya partikel yang terdapat dalam larutan. Partikel ini menghamburkan cahaya ke segala arah yang mengenainya. Turbidimetri adalah pengukuran spesies hamburan cahaya dalam larutan dengan memanfaatkan intensitas cahaya berkas masuk setelah dilewatkan melalui larutan.

Dalam turbidimetri digunakan larutan yang berupa koloid atau tersuspensi. Larutan jernih juga dapat diukur dengan metoda ini dengan jalan memberikan emulgator untuk mengemulsi larutan. Larutan tersuspensi atau koloid mengandung partikel yang berukuran besar dari 10^{-10} cm. Ukuran partikel ini biasanya dapat dilihat dengan mata. Kegunaan metode turbidimetri antara lain untuk menentukan kadar senyawa tertentu yang terdapat pada suatu tempat yaitu dengan merubahnya terlebih dahulu menjadi senyawa yang sulit larut, kemudian diberi emulgator. Contohnya penentuan kadar kalsium dalam suatu batuan, dimana sebelumnya kalsium diubah menjadi kalsium karbonat yang sulit larut, kemudian ditambahkan emulgator.

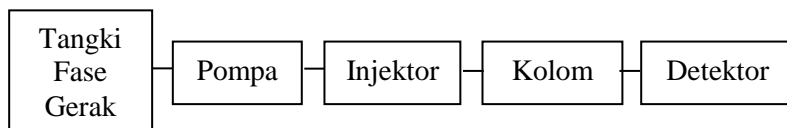
Analisa kuantitatif secara turbidimetri didasarkan pada intensitas cahaya yang diteruskan, setelah cahaya tersebut melalui larutan yang mengandung partikel-partikel tersuspensi dari zat yang dianalisa. Hamburan yang terukur pada alat turbidimeter adalah hamburan yang diteruskan atau yang membentuk sudut 180° . Sedangkan hamburan yang membentuk sudut 90° , hamburannya terdeteksi oleh alat nefelometer (Kopkar, 1990).

2.9.2 *Liquid Chromatography-Time of Flight/Mass Spectrometer*(LC-TOF/MS)

Liquid Chromatography-Time of Flight/Mass Spectrometer (LC-TOF MS) merupakan perpaduan antara instrumentasi *high performance liquid chromatography*(HPLC) dengan *time of flight mass spectrometer* (TOF MS). Gabungan kedua alat tersebut sering digunakan untuk menskrining polutan mikro organik dalam air. Dalam instrumentasi ini HPLC berperan dalam metode pemisahan senyawa secara kromatografi berdasarkan interaksi antara sampel dengan fase diam dan fase geraknya sedangkan TOF MS berperan dalam memberikan informasi spektrahasil scan penuh dengan sensitifitas dan akurasi massa yang tinggi (Winefordner, 2009).

Kromatografi merupakan metode pemisahan fisik dimana komponen yang dipisahkan terbagi menjadi dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fasa gerak digambarkan sebagai fasa yang mengalir disepanjang fase diam dengan arah yang pasti. Fase gerak dapat berupa gas maupun cair. Fase diam merupakan fase dimana terjadi pemisahan sampel berdasarkan interaksinya dengan fase gerak. Fase diam pada umumnya berupa padatan atau gel. Dalam kromatografi kedua fasa tersebut sangat berpengaruh terhadap pemisahan sampel yang dilakukan. Pada HPLC fase gerak yang digunakan berupa cairan dengan diberi tekanan hingga 400 bar (4×10^{-7} Pa) untuk memastikan tingkat alirannya konstan. Untuk fase diamnya digunakan kolom yang mampu menahan tekanan tinggi yang diperlukan. Pemisahan kromatografi akan terjadi jika terjadi perbedaan interaksi diantara komponen-komponen fase gerak dengan fase diamnya sehingga membutuhkan waktu yang berbeda untuk keluar dari kolom. Mayoritas pemisahan HPLC dilakukan dengan menggunakan kromatografi fase terbalik dimana fase geraknya lebih polar

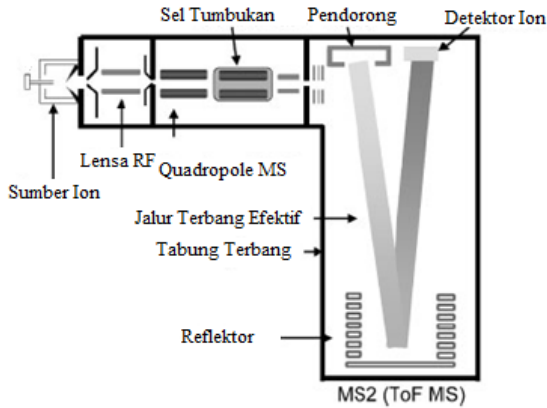
dibanding fase diam. Dalam sistemnya, analit lebih polar akan terelusi lebih cepat dibanding yang kurang polar (Ardrey, 2003).



Gambar 2.6 Skema alat HPLC (Ardrey, 2003)

Dalam kromatografi terdapat dua metode elusi yaitu metode isokratik dan metode gradien. Metode elusi isokratik merupakan metode elusi dengan komposisi fase gerak yang konstan. Sedangkan metode elusi gradien merupakan metode elusi dengan menggunakan komposisi fase gerak yang berubah-ubah (Ardrey, 2003).

Time of flight mass spectrometer (TOF/MS) merupakan instrumentasi pemisah massa. Prinsip dasar dari TOF/MS adalah semua ion yang diberi energi kinetik yang sama akan menghasilkan kecepatan yang berbanding terbalik dengan akar kuadrat massanya. Hal tersebut mengakibatkan waktu yang dibutuhkan oleh masing-masing ion untuk melewati tabung penerbangan dari spektrometer massa akan bergantung pada nilai m/z dari ion tersebut. Spektrum masa secara sempurna akan didapat ketika ion yang diterbangkan telah mencapai detektor. Dalam TOF MS hal yang terpenting adalah ion dari semua rasio m/z pada sumber di transfer secara bersamaan kedalam *mass analyzer* dengan waktu yang telah diketahui sehingga waktu terbang dan rasio m/z mereka dapat ditentukan dengan akurat (Ardrey, 2013). Skema alat TOF/MS dijelaskan pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Skema alat TOF MS (Lacorte, 2006)

TOF/MS memiliki akuisisi dan kecepatan yang tinggi dalam menyediakan pengukuran massa yang akurat. TOF MS memiliki kemungkinan untuk menghasilkan akurasi massa <2 ppm dengan rentang kalibrasi yang cukup memadai. Pengukuran massa yang akurat mampu memberikan komposisi unsur ion utama maupun ion hasil fragmentasi yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies yang tidak diketahui (Lacorte, 2006).

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: erlenmeyer berpenutup spons, gelas beker, neraca digital, jarum ose, cawan petri steril, gelas ukur, pipet volume, propipet, *autoclave*, tabung falcone, sentrifuge, *incubator shaker*, spektrofotometer UV-VIS Genesys 10S, dan instrumen LC-TOF MS (Bruker Impact HD).

3.1.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: bakteri *Ralstonia pickettii* NBRC 102503, pewarna tekstil metilen biru (SAP Chemicals, *purity* 96%), *nutrien agar* (NA) (Merck), *nutrien broth* (NB) (Merck), alkohol teknis, dan aqua DM.

3.2. Regenerasi Bakteri

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Ralstonia pickettii*. Bakteri tersebut diperoleh dari koleksi bakteri Laboratorium Kimia Mikroorganisme Departemen Kimia FMIPA ITS. Bakteri diambil dengan ose dan diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi medium agar NA dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

3.3. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Kurva pertumbuhan bakteri dibuat untuk bakteri yang telah diregenasi. Bakteri hasil regenerasi di ambil sebanyak satu ose dan diinokulasikan ke dalam 10 mL NB. Kultur tersebut

diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam dalam kondisi *dishaker* dengan kecepatan 180 rpm. Sebanyak 1 mL kultur dimasukkan kedalam 450 mL NB medium dan diukur optikal densitinya pada panjang gelombang 600 nm (OD₆₀₀) dengan spektrofotometri UV-Vis tiap 1 jam sekali. Kurva dibuat dengan absorbansi sebagai fungsi waktu. Apabila biakan telah mencapai fase kematian yang ditandai dengan adanya penurunan absorbansi, maka preinkubasi dan pengukuran dihentikan (Asjam, 2013).

3.4. Biodekolorisasi Metilen Biru oleh *R. pickettii* pada Media Cair

Dalam percobaan ini dibuat prekultur bakteri pada media cair terlebih dahulu. Bakteri *R. pickettii* diambil dengan ose dan diinokulasikan ke dalam 50 mL media cair NB. Kultur diinkubasi selama 30 jam pada suhu 30 °C. Setelah 30 jam, dimasukkan MB kedalam kultur hingga mencapai konsentrasi akhir 100mg/L. Kultur yang telah ditambah MB diinkubasi pada *incubator shaker* selama 18 jam pada suhu 30 °C dengan kecepatan 120 rpm. Pada jam ke 0, 3, 6, 9, 12, 15 dan 18, kultur di sentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatannya. Supernatan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis. Untuk kontrol dibuat media cair NB ditambah dengan MB hingga mencapai konsentrasi 100 mg/L. Untuk menghitung presentase dekolorisasi pewarna MB sesuai persamaan:

$$\% \text{dekolorisasi} = \frac{A_k - A_t}{A_k} \times 100\% \quad (3.1)$$

dimana :

A_k :Absorbansi kontrol (MB 100 mg/L)

A_t :Absorbansi pada sampel

(Nezamzadeh, 2014)

3.5 Analisa Dekolorisasi Metilen Biru dan Metabolit Produknya

Analisa degradasi MB dan metabolit produknya dilakukan dengan menyaring supernatan hasil sentrifugasi kemudian filtrat yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan instrumen LC-TOF MS. Sumber ionisasi yang dipakai adalah elektrosprai ionisasi (ESI) dengan range massa yang dipakai 50-500. Metode elusi yang dipakai adalah metode gradien dengan laju alir 0,2 mL/min pada tiga menit pertama dan tujuh menit selanjutnya menggunakan laju alir 0,4 mL/min. Fase gerak yang digunakan adalah metanol dan air dengan perbandingan 99:1 pada tiga menit awal dan 61:39 untuk tujuh menit sisanya. Kolom yang digunakan adalah kolom jenis Acclaim TM RSLC 120 C18 dengan ukuran 2,1x100 mm dan suhu kolom 33 °C.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Regenerasi Bakteri *Ralstonia pickettii*

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *R. pickettii* NBRC 102503 yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Kimia Mikroorganisme Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya. Ryan dkk. (2006) melaporkan bahwa bakteri *R. pickettii* tersebut merupakan bakteri pendegradasi senyawa xenobiotik seperti toluena dan trikloroetilena. Di sisi lain Plaza dkk. (2006) melaporkan *R. pickettii* dapat mendegradasi benzena dengan baik, dengan waktu inkubasi 5 jam degradasi dapat mencapai hampir 100%. Hal tersebut mengindikasikan bahwa *R. pickettii* memiliki aktivitas yang tinggi terhadap polutan organik.

Proses regenerasi bakteri dalam penelitian ini bertujuan untuk mengaktifkan kembali bakteri yang akan digunakan dalam proses biodekolorisasi MB. Regenerasi bakteri ini perlu dilakukan karena sebelumnya bakteri yang digunakan tersimpan sebagai stok dalam posisi nonaktif pada suhu rendah. Untuk regenerasi bakteri, diambil 1 ose dan diinokulasikan kedalam media Nutrien Agar (NA), yang kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C. Media NA dipilih sebagai media inokulasi karena memiliki kandungan nutrisi sesuai kebutuhan perkembangbiakan bakteri. Media NA mengandung ekstrak daging yang merupakan sumber karbohidrat dan vitamin bagi bakteri, pepton sebagai sumber nitrogen yang merupakan prekursor asam amino, protein dan enzim bagi bakteri, NaCl sebagai media pengatur tekanan osmosis pada bakteri agar nutrisi pada media dapat masuk ke dalam sel bakteri (Thomas dkk., 2011). Sebelum digunakan pada proses biodekolorisasi MB, bakteri yang digunakan dalam penelitian ini

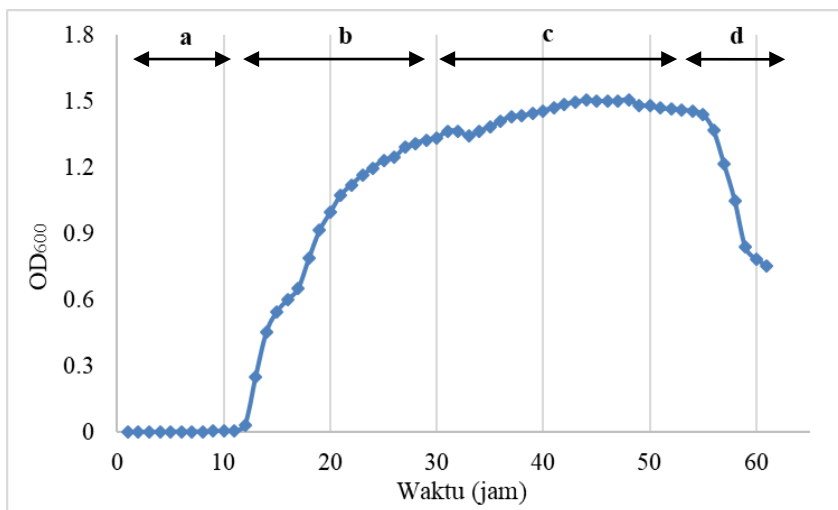
harus dipre-inkubasi terlebih dahulu. Pre-inkubasi ini dilakukan agar mikroorganisme dapat tumbuh beradaptasi terlebih dahulu terhadap media yang baru. Dengan adanya proses adaptasi tersebut mikroorganisme akan mulai tumbuh dan memproduksi metabolit dan enzim-enzim yang digunakan pada proses degradasi sehingga mikroorganisme tersebut siap untuk diaplikasikan dalam proses biodekolorisasi. Dalam pre-inkubasi bakteri, 1 ose bakteri diinokulasikan kedalam media NB dan diinkubasi sesuai waktu fasa stasioner bakteri pada suhu 30 °C. Waktu pre-inkubasi bakteri dipilih sampai bakteri mencapai fasa stasionernya dikarenakan pada fasa tersebut bakteri mulai berhenti berkembang biak sehingga energinya lebih difokuskan untuk memproduksi metabolit sekunder sebagai upaya untuk mempertahankan diri. Dengan demikian pada fase tersebut merupakan fase optimal dimana bakteri memproduksi metabolit sekunder dan enzim-enzim (Asjam, 2013).

4.2 Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Dalam penelitian ini pembuatan kurva standar bakteri bertujuan untuk mencari waktu fasa stasioner dari bakteri *R. pickettii*. Fasa stasioner bakteri perlu dicari karena pada fase tersebut bakteri memiliki kemampuan yang optimal untuk memproduksi metabolit sekunder yang mampu meningkatkan kemampuan degradasi MB (Maier, 2009). Pembuatan kurva standar dalam penelitian ini dilakukan dengan metode turbidimetri pada *optical density* OD₆₀₀. Metode Turbidimetri merupakan metode pengukuran jumlah sel bakteri berdasarkan kekeruhan. Metode ini mengukur pengurangan intensitas cahaya pada spektrofotometer akibat adanya penghamburan cahaya oleh sel-sel bakteri yang ada pada kuvet. Adanya penghamburan cahaya tersebut mengakibatkan turunnya intensitas cahaya yang

akan dinotasikan sebagai suatu nilai. Semakin besar nilai tersebut menunjukkan semakin banyak jumlah sel bakteri yang ada didalam kuvet (Widdel, 2010). OD_{600} menunjukan bahwa pada penelitian ini digunakan cahaya pada panjang gelombang 600nm dalam pembuatan kurva pertumbuhan. Panjang gelombang 600 nm dipilih karena pada warna kultur bakteri dimana 540 nm digunakan untuk kultur yang berwarna kuning terang dan 600-625 nm digunakan untuk kultur yang berwarna kuning-coklat (Asjam, 2014).

Kurva pertumbuhan dibuat dengan cara meregenerasi bakteri kedalam 10 mL media NB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Regenerasi tersebut bertujuan untuk mengaktifkan kembali sel bakteri yang sebelumnya disimpan sebagai stok. Selanjutnya kultur hasil regenerasi masing-masing bakteri diambil sebanyak 1 mL dan di inokulasikan kedalam 450 mL media NB dan diinkubasi pada suhu 30°C sampai diperoleh fasa kematian bakteri. Selama masa inkubasi, absorbansi bakteri diukur setiap jamnya dengan spektrofotometer pada OD_{600} untuk mengetahui fase pertumbuhan dari *R. pickettii*. Dalam penelitian ini diperoleh data kurva pertumbuhan *R. Pickettii* seperti pada Gambar 4.1.



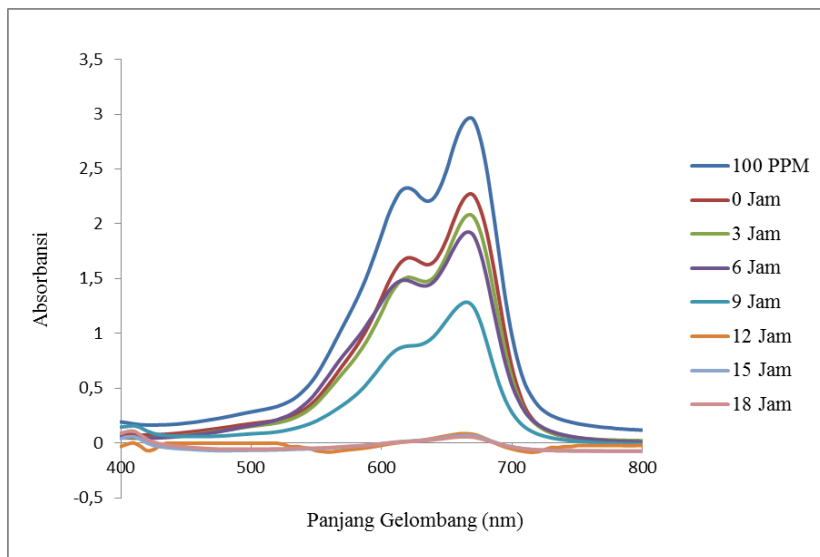
Gambar 4.1. Kurva pertumbuhan *R. pickettii*. a. fase lag, b. fase eksponensial, c. fase stasioner, dan d. fase kematian.

4.3 Biodekolorisasi Metilen Biru oleh *R. Pickettii*

Dalam penelitian ini kemampuan *R. pickettii* dalam mendegradasi MB dilakukan pada media cair. Setiap kultur diinokulasi dengan 1 mL bakteri hasil pre-inkubasi sebelumnya. 1 mL bakteri yang diinokulasi setara dengan $1,44 \times 10^{13}$ CFU. Kultur diinkubasi pada suhu 30 °C selama 18 jam. Waktu inkubasi dilakukan selama 18 jam karena pada jam ke-12, 15, dan 18 proses biodekolorisasi tidak menunjukkan perbedaan hasil yang signifikan. Sehingga pada jam ke-18, waktu inkubasi untuk proses biodekolorisasi dihentikan.

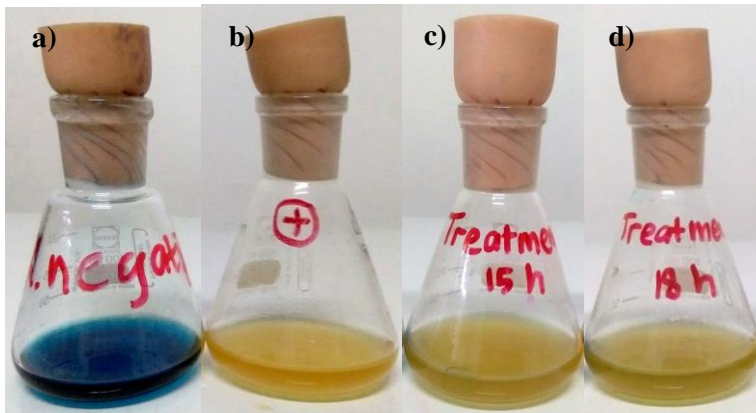
Pada jam ke 0, 3, 6, 9, 12, 15 dan 18 setelah penambahan MB dilakukan analisa dengan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui kemampuan *R. pickettii* dalam mendegradasi MB. Analisa dimulai dengan memisahkan kultur yang mengandung

pewarna dan biomassa sel bakteri dengan sentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifuge di analisa dengan spektrofotometer UV-Vis dengan metode scanning pada panjang gelombang 400-750 nm. Panjang gelombang 400-750 nm merupakan daerah panjang gelombang sinar tampak dimana MB mengabsorb gelombang pada daerah sinar tampak tersebut (Rahman, 2012). Analisa spektrofotometer UV-VIS juga dilakukan pada kontrol yang merupakan campuran antara MB dan NB guna menentukan profil absorbansi awal sebelum MB terdegradasi. Dari analisa dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS diperoleh profil absorbansi seperti yang dijelaskan pada Gambar 4.2. berikut :



Gambar 4.2 Profil Degradasi Metilen Biru oleh *R. pickettii*

Dari Gambar 4.2 diatas, hasil analisa profil absorbansi keempat sampel tersebut memunculkan absorbansi maksimal pada panjang gelombang yang sama. Hal tersebut menunjukkan bahwa dalam keempat sampel tersebut masih mengandung MB dan belum sepenuhnya terdegradasi. Untuk tiga sampel berikutnya, yaitu kultur jam ke-12, 15, 18 gelombang maksimal bukan pada 670 nm. Hal ini dikarenakan warna kuning (warna dari media NB) lebih dominan dibandingkan dengan warna dari MB. Dari data profil absorbansi dapat diketahui bahwa profil absorbansi degradasi jam ke 0 lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Hal tersebut menunjukan bahwa pada jam ke 0, MB sudah mulai terdegradasi. Kemampuan *R. pickettii* mendegradasi pada jam ke 0 dapat dikarenakan oleh adanya metabolit sekunder atau enzim yang dikeluarkan oleh *R. pickettii* pada saat pre-inkubasi. Pada jam ke-3, profil absorbansinya turun tidak jauh dari jam ke 0. Hal tersebut dapat dikarenakan kultur *R. pickettii* masih beradaptasi dengan adanya penambahan MB sehingga kemampuan dekolorisasinya belum optimal. Pada jam ke-9, profil absorbansinya semakin turun yang menunjukkan bahwa *R. pickettii* telah berhasil beradaptasi dengan MB dan mulai mendekolorisasi MB. Semakin tingginya produksi enzim ekstraselular oleh *R. pickettii*, memungkinkan semakin tingginya kemampuan *R. pickettii* dalam mendekolorisasi MB. Gambar 4.3. merupakan profil visualisasi dekolorisasi MB oleh *R. pickettii* pada media NB selama inkubasi 18 jam. Perubahan warna terjadi dari jam ke 0 sampai jam ke 18 dimana warna biru berangsur-angsur memudar.



Gambar 4.3 Degradasi MB oleh *R. Pickettii* pada media cair. Kontrol negatif (a), kontrol positif (b), *treatment* 15 jam (c), *treatment* 18 jam (d).

Kemampuan *R. pickettii* dalam mendegradasi MB secara kuantitatif ditentukan dengan cara mengukur presentase dekolorisasinya. Presentase dekolorisasi tersebut diperoleh dari mengurangi absorbansi kontrol pada λ_{max} dengan absorbansi *treatment* pada λ_{max} dibagi dengan absorbansi kontrol pada λ_{max} dan dikali dengan 100% (Gadd, 2001). Presentase dekolorisasi menunjukkan kemampuan *R. pickettii* dalam mendegradasi MB. Dalam hal ini λ_{max} yang digunakan yaitu pada panjang gelombang maksimal 670 nm. Dari data absorbansi yang diperoleh selanjutnya dilakukan perhitungan presentase dekolorisasi sesuai dengan persamaan 3.1 dan diperoleh hasil seperti pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil Degradasi Metilen Biru oleh *R. pickettii*

Waktu Inkubasi (jam)	Absorbansi	% Degradasi
0	2,27	23,33 ^a
3	2,07	29,94 ^b
6	1,90	35,64 ^c
9	1,25	57,71 ^d
12	0,08	97,21 ^e
15	0,07	97,70 ^e
18	0,06	98,11 ^e

Perbedaan alfabet menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan berdasarkan hasil uji T dengan derajat kebebasan $p < 0,05$.

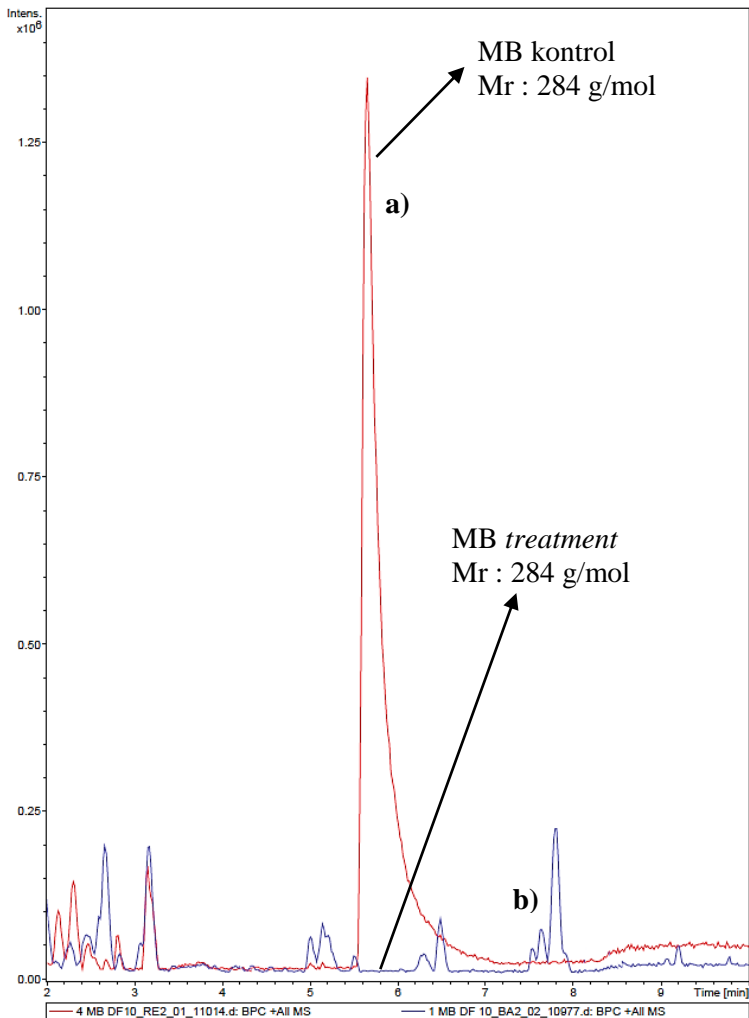
Pengukuran absorbansi dilakukan secara triplo untuk setiap kultur bakteri untuk meminimalisir adanya kesalahan. Terdapat tiga kultur bakteri untuk setiap waktu inkubasi. Pada waktu inkubasi jam ke-0 terlihat adanya degradasi MB yang cukup signifikan, hal ini dimungkinkan karena adanya enzim ekstraselular bakteri dari hasil pre-inkubasi. Pada jam ke-12, 15, dan 18 terjadi adanya peningkatan persen degradasi tetapi tidak signifikan. Hal tersebut didukung dengan uji T antara jam ke-12 dan jam ke-15, jam ke-15 dan jam ke-18 yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan. Dengan demikian dapat diketahui bahwa setelah waktu inkubasi 12 jam kemampuan degradasi dari *R. pickettii* melemah.

Kemampuan bakteri jenis *R. pickettii* tersebut dalam mendekolorisasi MB berkaitan dengan kemampuannya dalam memproduksi enzim pendegradasi dalam proses metabolismenya. Riyan dkk. (2007) menjelaskan bahwa bakteri jenis *R. pickettii*

mampu menghasilkan enzim hidroksilase berupa 2,4,6-trichlorophenol-4-dechlorinase yang berperan dalam degradasi polutan terklorinasi berupa triklorofenol. Selain memiliki kemampuan menghasilkan enzim pendegradasi, *R. pickettii* juga mampu menghasilkan biosurfaktan yang juga berperan dalam proses biodekolorisasi. Plaza dkk. (2005) juga melaporkan bahwa bakteri jenis *R. pickettii* juga memiliki kemampuan untuk memproduksi biosurfaktan yang dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan kemampuan bioremediasi terhadap tanah yang terkontaminasi petroleum hidrokarbon.

4.4. Analisa Dekolorisasi MB dan Metabolitnya Menggunakan LC-TOF/MS

Analisa metabolit produk hasil dekolorisasi MB dilakukan dengan menggunakan instrumentasi LC-TOF/MS. LC-TOF/MS merupakan gabungan dari instrumentasi HPLC dan TOF/MS dimana HPLC berperan dalam pemisahan secara kromatografi dan menghasilkan kromatogram, sedangkan TOF MS berperan dalam memberikan data m/z dari senyawa yang dideteksi (Winefordner, 2009). Dalam penelitian ini analisa LC-TOF MS dilakukan di PT. Angler Biochemical Lab dimana sumber ionisasi yang dipakai adalah elektrospai ionisasi (ESI) dengan range massa yang dipakai 50-500. Metode elusi yang dipakai adalah metode gradien dengan laju alir tiga menit pertama 0,2 mL/min, tujuh menit selanjutnya menggunakan laju alir 0,4 mL/min. Fase gerak yang digunakan adalah metanol dan air dengan perbandingan 99:1 pada tiga menit awal dan 61:39 untuk tujuh menit sisanya. Kolom yang digunakan adalah kolom jenis Acclaim TM RSLC 120 C18 (polar) dengan ukuran 2,1x100 mm dan suhu kolom 33 °C. Dari analisa dengan LC-TOF MS didapatkan hasil pada Gambar 4.4.

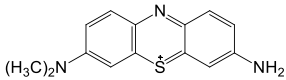
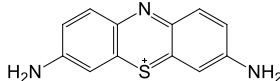
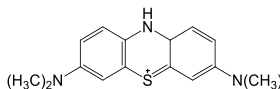
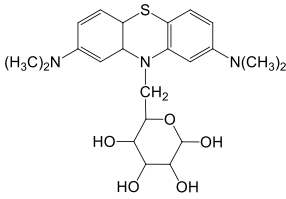


Gambar 4.4 Kromatogram Hasil Dekolorisasi MB oleh *R. pickettii* selama 18 jam. Kromatogram merah : kromatogram kontrol (a), kromatogram biru tua : kromatogram *treatment* (b).

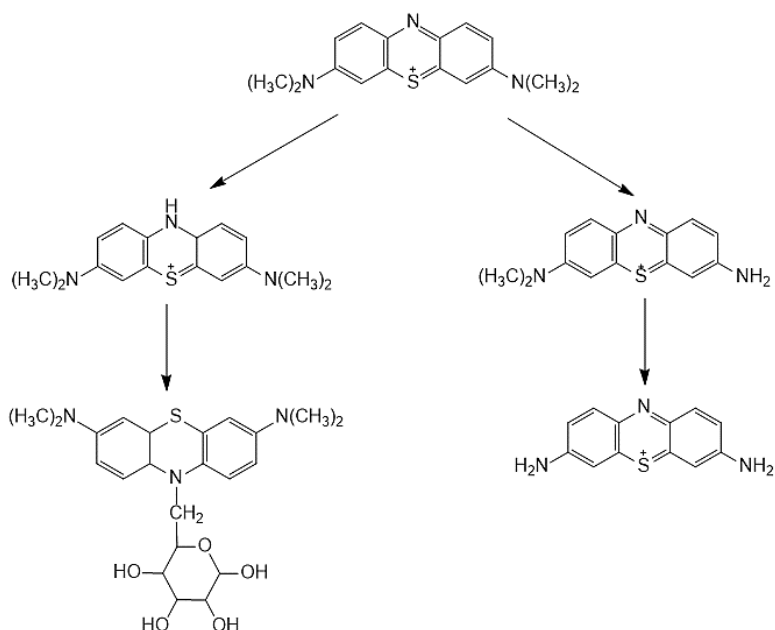
Pada kromatogram hasil analisa LC-TOF/MS yang didapat muncul puncak yang sama antara kontrol dan *treatment* pada waktu retensi 5,57 menit. Berdasarkan data TOF/MS nya kedua senyawa tersebut memiliki m/z 284 yang merupakan senyawa MB. Berdasarkan kromatogram diatas puncak MB pada *treatment* intensitasnya lebih rendah dibandingkan dengan puncak MB pada kontrol. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada kultur *treatment* MB telah mengalami dekolorisasi yang signifikan. Selain muncul puncak yang sama antara kontrol dan *treatment*, pada kromatogram *treatment* juga muncul puncak-puncak baru yang belum ada pada kromatogram kontrol yang diduga sebagai metabolit produk yang dihasilkan selama proses dekolorisasi 18 jam. Puncak-puncak baru pada kromatogram *treatment* muncul pada *retention time* 2,67; 5,01; 6,49; 7,79 menit.

Berdasarkan data TOF-MS, puncak pada waktu retensi 2,67 menit memiliki m/z 254 dimana berdasarkan *library* kemungkinan senyawa tersebut merupakan $C_{14}H_{14}N_3S$ (azure A). Puncak pada waktu retensi 5,01 menit memiliki nilai m/z 224 berdasarkan *library* senyawa tersebut merupakan $C_{12}H_{10}N_3S$ (thionin). Hal ini didukung oleh penelitian dari Rauf (2010) yang menemukan senyawa tersebut pada degradasi MB dengan metode fotokatalisis. Puncak pada waktu retensi 6,49 menit memiliki m/z sebesar 286 dimana berdasarkan *library* senyawa tersebut diduga merupakan senyawa $C_{16}H_{20}N_3S$. Puncak pada waktu retensi 7,79 menit memiliki m/z sebesar 447 dimana berdasarkan *library* senyawa tersebut diduga merupakan $C_{22}H_{31}N_3SO_5$. Hal tersebut didukung dari penelitian dari Li, dkk (2014), terdapat senyawa yang sama dari hasil dekolorisasi pewarna Azure B oleh *Bacillus* sp. MZS10. Keempat senyawa tersebut merupakan senyawa-senyawa metabolit produk yang dihasilkan dalam proses dekolorisasi MB oleh *R. pickettii* selama 18 jam.

Tabel 4.2. Hasil analisa metabolit produk dekolorisasi MB dengan LC-TOF MS.

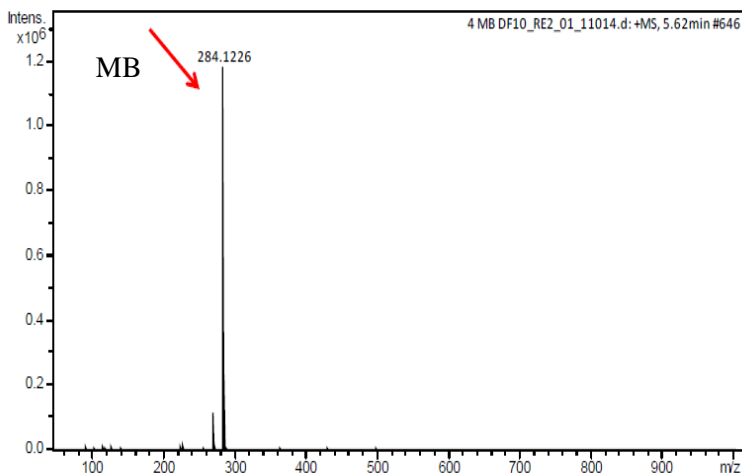
No.	Waktu Retensi (min)	Massa Molekul	Rumus Molekul	Struktur Molekul
1.	2,67	256	$C_{14}H_{14}N_3S$	 <p>Azure A</p>
2.	5,01	228	$C_{12}H_{10}N_3S$	 <p>Thionin</p>
3.	6,49	286	$C_{16}H_{20}N_3S$	
4.	7,79	449	$C_{22}H_{31}N_3SO_5$	

Warna biru pada pada kultur *treatment* yang berangsur-angsur menghilang dikarenakan adanya perubahan gugus kromofor pada metilen biru. Hal ini dapat dilihat pada senyawa yang ada pada *retention time* 6,49 ikatan rangkap pada gugus kromofor metilen biru terputus sehingga membentuk senyawa $C_{16}H_{20}N_3S$. Pada *retention time* 7,79 metilen biru mengalami hidrogenasi yang kemudian bereaksi dengan glukosa yang ada pada media sehingga terbentuk senyawa $C_{22}H_{31}N_3SO_5$. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelien Li, dkk. (2014). Selain itu penelitian Li, dkk. (2014) telah membuktikan bahwa tingkat toksisitas senyawa $C_{22}H_{31}N_3SO_5$ lebih rendah dibanding metilen biru.



Gambar 4.5 Usulan jalur dekolorisasi MB oleh *R. picketti*

Dari hasil metabolit produk diatas dapat diusulkan kemungkinan jalur dekolorisasi MB yang dilalui. Dari hasil metabolit tersebut dimungkinkan ada dua jenis jalur. Jalur yang pertama dimana MB mengalami demetilasi dan kehilangan dua gugus metil dan membentuk senyawa $C_{14}H_{14}N_3S$ (azure A). Pada metabolit kedua (waktu retensi 5,01 menit) MB mengalami demetilasi lanjutan sehingga kehilangan empat gugus metil dan membentuk senyawa $C_{12}H_{10}N_3S$ (thionin) (Rauf, 2010). Jalur dekolorisasi yang kedua yaitu putusnya ikatan rangkap pada gugus amina yang merupakan gugus kromofor dari MB sehingga membentuk senyawa $C_{16}H_{20}N_3S$. Setelah terjadi pemutusan ikatan rangkap pada gugus amina, terjadi pemutusan ikatan rangkap lanjutan pada gugus sulfida, kemudian bereaksi dengan glukosa pada gugus amina sehingga membentuk senyawa $C_{22}H_{31}N_3SO_5$. Glukosa yang ada pada metabolit berasal dari media yaitu *nutrient broth* (NB) (Li, dkk, 2014).



Gambar 4.6 Spektra MS Metilen Biru

Dari hasil analisa LC-TOF/MS didapatkan massa molekul metilen biru sebesar 284,1226 g/mol. Mayoritas fragmen yang ada pada metilen biru bersifat tidak stabil. Sehingga fragmen yang muncul pada spektra MS hanya sedikit. Fragmen yang paling stabil dengan m/z sebesar 284,1226 g/mol, yang menunjukkan struktur metilen biru yang kehilangan klor. Hilangnya klor karena adanya ionisasi pada larutan media. Massa molekul metilen biru yang didapat pada penelitian ini sesuai dengan penelitian Rizqi dan Purnomo (2017) yang mendapatkan massa molekul metilen biru sebesar 284 g/mol.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Bedasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa *R. pickettii* dapat mendekolorisasi metilen biru (MB) pada media cair (NB). Dalam media cair, *R. pickettii* mampu mendekolorisasi MB sebesar 98,11% setelah diinkubasi selama 18 jam. Dari proses degradasi MB oleh *R. pickettii* dihasilkan metabolit produk berupa $C_{14}H_{14}N_3S$ (azure A), $C_{12}H_{10}N_3S$ (thionin), $C_{16}H_{20}N_3S$, $C_{22}H_{31}N_3SO_5$. Penelitian ini mengindikasikan bahwa *R. pickettii* dapat digunakan untuk mendekolorisasi MB.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kondisi optimal *R. pickettii* untuk mendekolorisasi MB terkait kondisi pH, ketersediaan oksigen, dan variasi media yang optimal.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

- Akdogan, Hatice A, Topus, Merve C, Urhan, Asiye A. (2014). Studies on Decolorization of Reactive Blue 19 Textile Dye by *Coprinus plicatilis*. Journal of Environmental Health Science & Engineering 2014, 12:49.
- Ardrey, Robert E. (2003). Liquid Chromathography-Mass Spectrometry : an Introduction. Wiley. England.
- Asjam, K., (2013), *Pengaruh Penambahan Pseudomonas aeruginosa Terhadap Biodegradasi DDT Oleh Pleurotus ostreatus*, Skripsi Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.
- Asranudin, Putra SR., (2016), Efek Penambahan PEG 400 Pada Plastik PHA Yang Diproduksi Dari *Ralstonia pickettii*, JURNAL SAINS DAN SENI ITS Vol. 5, No.1, 2337-3520.
- Atlas, RM. (1981). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. Microbiol Rev 45(1):180-209.
- Benkli, YE, Can MF, Turan & Celik MS. (2005). Modification of Organo-zeolite Surface for Removal of Reactive Azo Dyes in Fixed-bed Reactors. Journal of Water Research, 39 , 487.
- Budavari S (1996) The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Whitehouse Station, NJ, Merck.
- Chatwal, Gurdeep R. (2009). Synthetic Dyes. Himalaya Publishing House. New Delhi.
- Cooney, JJ. (1984). The Fate of Petroleum Pollutans In Fresh Water Ecosystem - Petroleum Microbiology. Dibble, JT., Bartha R. (1979). Effect of Environmental Parameters on The Biodegradation of Oil Sludge. Appl Environ Microbiol 37(4):729-739.
- Eris, Fitria R. (2006). Pengembangan Teknik Bioremidiasi Dengan Slurry Bioreaktor Untuk Tanah Tercemar

- Minyak Diesel. (Thesis) Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Gadd, Geoff M. (2001). *Fungi in Bioremediation*. Cambridge University Press. New York.
- Hamdaoui, O. and Chiha, M. (2006). Removal of Methylene Blue from Aqueous Solutions by Wheat Bran. *Acta Chim.* 54 : 407–418.
- Harmita. 2006. *Buku Ajar Analisa Fisikokimia*. Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia. Depok, pp. 144–161.
- Hermawan, Iwan. (2011). Analisa Dampak Kebijakan Makroekonomi Terhadap Perkembangan Industri Tekstil dan Produk Tekstil Indonesia. *Buletin Ekonomi dan Perbankan*. 373–406.
- Kopkar. 1990. *Konsep Dasar Kimia Analisa*, Penerbit UI Press : Jakarta hal 207 – 213.
- Kukor, J.J. and Olsen, R.H. (1990) Molecular cloning, characterization, and regulation of a *Pseudomonas pickettii* PKO1 gene encoding phenol hydroxylase and expression of the gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1c. *J Bacteriol* 172, 4624–4630.
- Kukor, J.J. dan Olsen, R.H. (1992) Complete nucleotide sequence of *tbuD*, the gene encoding phenol / cresol hydroxylase from *Pseudomonas pickettii* PKO1, and functional analysis of the encoded enzyme. *J Bacteriol* 174, 6518–6526.
- Lacorte, Silvia, Alba, Amadeo R. (2006). Time of Flight Mass Spectrometry Applied to The Liquid Chromatographic Analysis of Pesticides in Water and Food. Wiley Inter Science. DOI 10.1002/mas.20094.
- Laksono, S. 2012. Pengolahan Biologis Limbah Batik Dengan Media Biofilter. [Skripsi Ilmiah]. Depok: Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- Li, H., Zhang, R., Tang, L., Zhang, J., Mao, Z. (2014). Evaluation of *Bacillus* sp. MZS10 for decolorizing Azure B dye and

- its decolorization mechanism. *Journal of Environmental Sciences* 26. 1125–1134.
- Maier, R.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P., (2009), *Environmental Microbiology second Editio*, Academic Press Elsevier, UK.
- Manurung, Renita., Rosdanelli Hasibuan dan Irvan. (2004). Perombakan Zat Warna Azo Reaktif Secara Anaerob-Aerob. Repository USU. Sumatera.
- Miclescu, Adriana and L. Wiklund. (2010). Methylene Blue, an Old Drug with New Indications. *Jurnalul Român de Anestezie Terapie intensivă* 2010 Vol.17 Nr.1, 35-41.
- Mulja, M, Suharman. (1995). *Analisa Instrumental*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Muzamil, MA., 2010. *Dampak Limbah Cair Pabrik Tekstil PT Kenaria Terhadap Kualitas Air Sungai Winong Sebagai Irigasi Pertanian di Desa Purwosuman Kecamatan Sidoharjo Kabupaten Sragen*. [Skripsi]. Surakarta : Fakultas Keguruan Dan Ilmu Pendidikan Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Nezamzadeh, Alireza, Shamsabadi. (2014). Comparison of Photocatalytic Efficiency of Supported CuO onto Microand Nano Particles of Zeolite X in Photo Decolorization of Methyleneblue and Methyl Orange Aqueous Mixture. *Applied Catalysis A: General* 477 (2014) 83–92.
- Nietzki, R. (1888). *Chemistry of The Organic Dyestuffs*. Gurney & Jackson Publishing. California.
- Olsen, R.H., Kukor, J.J. and Kaphammer, B. (1994) A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J Bacteriol* 76, 3749–3756.
- Papic, Sanja, Vujevic, Dinko, Koprivanac, Natalija, Sinko, Danijel. (2009). Decolorization and Mineralization of Commercial Reactive Dyes by Using Homogeneous and Heterogeneous Fenton and UV/Fenton Processes. *Journal og Hazardous Materials* 164(2009)1137-1145.

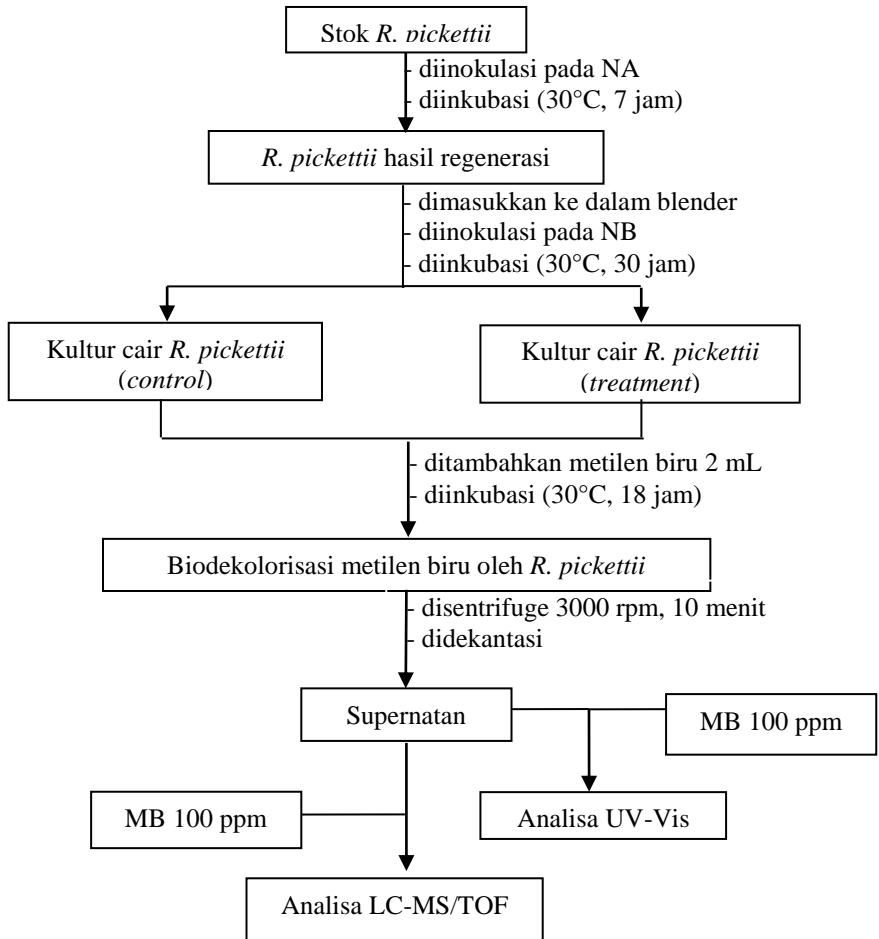
- Pavia, Donald L., Gary M. Lampman, George S. Kritz, Randall G. Engel (2006). *Introduction to Organic Laboratory Techniques* (4th Ed.). Thomson Brooks/Cole. pp. 797–817.
- Plaza, G.A., Ulfig, K., Brigmon, R.L., (2005), *Surface active properties of bacterial strain isolated from petroleum hydrocarbon bioremediated soil*, Pol J of Microbiol, vol 54(2):161-167.
- Plaza, G.A., Wypych, J., Berry. C., Brigmon, R.L., (2006), *Utilization of monocyclic aromatic hydrocarbons individually and in mixture by bacteria isolated from petroleumcontaminated soil*, World J Microbiol Biotechnol, vol 23:533–542.
- Qodri, A.A. (2011). Fotodegradasi Zat Warna Remazol Yellow FG dengan Fotokatalis Komposit TiO₂/SiO₂. Skripsi Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta. Surakarta.
- Rahman, Mohammad Arifur, Amin, S.M. Ruhul and Alam, A.M. Shafiqul. (2012). Removal of Methylene Blue from Waste Water Using Activated Carbon Prepared from Rice Husk. Dhaka Univ. J. Sci. 60(2): 185-189.
- Rauf, Muhammad A, Meetani, Mohammed, Khaleel, A. (2010). Photocatalytic Degradation of Methylene Blue Using a Mixed Catalyst and Product Analysis by LC/MS. Chemical Engineering Journal 157 (2010) 373–378.
- Riyanto dan Tatang Shabur Julianto. (2009). Degradasi Senyawa Metilen Biru dengan Metode Elektrolisis Menggunakan Elektroda Platinum. Jurnal Universitas Islam Indonesia. UII. Yogyakarta.
- Rizqi, H.D. (2014). Biodegradasi Pewarna Metilen Biru Oleh *Daedalea dickinsii*. Skripsi. Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya. Surabaya.
- Rizqi, H.D, Purnomo, A.S., (2017), *The ability of brown-rot fungus Daedalea dickinsii to decolorize and transform methylene blue dye*, World J Microbiol Biotechnol 33:92.

- Ryan, M.P., Pembroke J.T., Adley, C.C., (2006), *Ralstonia pickettii: a persistent gram negative nosocomial infectious organism*, J Hosp Infect, 62(3):278-284.
- Ryan, M.P., Pembroke, J.T., Adley, C.C., (2007), *Ralstonia pickettii in environmental biotechnology: potential and applications*, J App Microbiol, 103(4), 54-64.
- Sarioglu, F.S., Keskin, N.O.S., Celebioglu, A., Tekinay, T., Uyar, T., (2017), *Bacteria encapsulated electrospun nanofibrous webs for remediation of methylene blue dye in water*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.
- Skoog, Douglas A., Donald M. West, F. James Holler. 1991. *Fundamental of Analytical Chemistry*. Seventh Edition. New York: Saunders College Publishing.
- Skoog, Douglas A., Holler, J.F., Crouch, S.R. (1998). *Principles of Instrumental analysis* sixth Edition. Thomson Brooks/Cole. Canada.
- Sugiharto. (1987). *Dasar-dasar Pengolahan Air Limbah*, Cetakan I PAU Pangan dan Gizi. IPB. Bogor.
- Tejokusumo, B., 2007, *Limbah cair industri serta dampaknya terhadap kualitas air tanah dangkal di desa Gumpang kecamatan Kartasura*, *skripsi*, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Thomas, M., Mardiah., Mustafa., Santoso, A. (2011), *Teknik Isolasi dan Kultur*, Laboratorium Terpadu Biomedik USU, Medan.
- Trademap. Trade satatistic for international business development. www.trademap.org. Diakses pada tanggal 10 Januari 2017 pukul 12.58 WIB.
- Udiharto, M. (1996). *Bioremediasi minyak bumi*. Di dalam: *Prosiding Pelatihan dan Lokakarya Peranan Bioremediasi dalam Pengelolaan Lingkungan*; Cibinong. 24-28 Juni 1996. hlm 24-39.
- Widdel, Friedrich., (2010), *Theory and Measurement of Bacterial Growth*, *Grundpraktikum Mikrobiologie* Universitat Bremen, German.

- Winefordner, J.D. (2009). Liquid Chromatography Time of Flight Mass Spectrometry. Wiley Inc Publication. New Jersey.
- Yani, M., Fauzi AM., Aribowo F. (2003). Bioremediasi lahan terkontaminasi senyawa hidrokarbon. Di dalam: Prosiding Seminar Bioremediasi dan Rehabilitasi Lahan Sekitar Perminyakan dan Pertambangan; Bogor. 20 Februari 2003. Forum Bioremediasi IPB. Bogor.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir



Lampiran 2. Perhitungan

1. Pembuatan Larutan Metilen Biru 1000 mg/L dalam 50 mL NB

$$\text{Massa NB} = \frac{50 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 8 \text{ g}$$

$$= 0,4 \text{ g}$$

$$\text{Massa MB} = \frac{1000 \text{ mg}}{\text{L}} \times 50 \text{ mL}$$

$$= \frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \times 50 \text{ mL}$$

$$= 50 \text{ mg}$$

2. Pembuatan Larutan NB (450 mL) sebagai Media Cair

$$\text{Massa NB} = \frac{450 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 8 \text{ g}$$

$$= 3,6 \text{ g}$$

3. Tabel Perhitungan % Degradasi

Waktu inkubasi (jam)	Absorbansi pada $\lambda=670\text{nm}$	Rata-rata absorbansi	% degradasi
0	2,331	2,266444444	23,32732 ^a
	2,185		
	2,283333333		
3	2,107333333	2,070888889	29,94287 ^b
	2,163333333		
	1,942		
6	1,876	1,902555556	35,6375 ^c
	1,900333333		
	1,931333333		
9	1,450333333	1,250111111	57,70937 ^d
	1,282		
	1,018		
12	0,132666667	0,082333333	97,2147 ^e
	0,041		
	0,073333333		
15	0,068	0,067888889	97,70335 ^e
	0,070333333		
	0,065333333		
18	0,082	0,055888889	98,10931 ^e
	0,023		
	0,062666667		

Perbedaan alfabet menunjukkan perbedaan yang signifikan berdasarkan hasil uji T dengan derajat kebebasan $p < 0,05$

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

RIWAYAT PENULIS



Penulis memiliki nama lengkap Yulinar Dwi Nur Azizah , dilahirkan di Mojokerto, 30 Juli 1996, merupakan anak pertama dari dua bersaudara. Penulis telah menempuh pendidikan formal di SDN Wates VI (2002), SMP Negeri 1 Mojokerto (2008), dan SMA Negeri 1 Puri Mojoketo (2011). Pada tahun 2014, penulis diterima di Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut

Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya melalui jalur SNMPTN dan terdaftar dengan NRP 1414100084. Penulis mengambil bidang minat Mikroorganisme – Biodegradasi menggunakan jamur dibawah bimbingan Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D. Selama menempuh pendidikan di ITS, penulis aktif dalam organisasi Himpunan Mahasiswa Kimia ITS (HIMKA-ITS) periode 2015-2016 sebagai staff Hubungan Luar HIMKA-ITS dan sebagai Ketua Bidang Internasionalisasi Hubungan Luar HIMKA-ITS periode 2016-2017. Penulis juga aktif dalam mengikuti kompetisi nasional, diantaranya yaitu finalis TNPC 2017, Juara III Lomba Cipta Guna Limbah Nusantara, Juara III *Festival of Agroindustry*. Penulis pernah mengikuti *short program ITS Goes Global* Singapore batch 1. Penulis dapat dihubungi melalui email yulinarazizah@gmail.com.